

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039991**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.06

(21) Номер заявки
201792482

(22) Дата подачи заявки
2016.05.10

(51) Int. Cl. **C07K 7/56** (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ-ПЕПТИДОМИМЕТИКИ, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ВИРУС ГРИППА

(31) **62/159,833; 15173078.5**

(32) **2015.05.11; 2015.06.22**

(33) **US; EP**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/EP2016/060438**

(87) **WO 2016/180826 2016.11.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:
**Ван Донген Мария (NL), Бюйк
Кристоф Франсис Роберт Нестор,
Схепенс Вим Берг Грит (BE), Юрашек
Ярослав (NL), Кестелейн Барт
Рудольф Романи, Рабуассон Пьер
Жан-Мари Бернар (BE), Бранденбург
Буррис (NL)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-2011274702**

HOFFMANN JULIA ET AL.: "A new class of synthetic anti-lipopolysaccharide peptides inhibits influenza A virus replication by blocking cellular attachment", ANTIVIRAL RESEARCH, vol. 104, 30 January 2014 (2014-01-30), pages 23-33, XP028624666, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2014.01.015 paragraphs [03.1], [03.3]-[03.5]; table 1; compounds PEP19-2.5

MOHAMED RAJIK ET AL.: "A novel peptide inhibits the influenza virus replication by preventing the viral attachment to the host cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES, IVYSPRING INTERNATIONAL PUBLISHER, AUSTRALIA, vol. 5, no. 6, 8 August 2009 (2009-08-08), pages 543-548, XP008140577, ISSN: 1449-2288 tables 1, 2

(57) Изобретение относится к новым соединениям-пептидомиметикам, которые могут связывать и/или нейтрализовать вирусы гриппа, в частности вирусы гриппа А филогенетической группы 1, и к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения. Настоящее изобретение также относится к применению соединений-пептидомиметиков при диагностике, профилактике и/или лечении инфекций, вызванных вирусом гриппа.

B1**039991****039991****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины. Настоящее изобретение относится к новым соединениям-пептидомиметикам, которые могут связывать и/или нейтрализовать вирусы гриппа, в частности вирусы гриппа А филогенетической группы 1, и к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения. Настоящее изобретение также относится к применению соединений-пептидомиметиков при диагностике, профилактике и/или лечении инфекций, вызванных вирусом гриппа.

Уровень техники

Сезонный вирус гриппа А является основной проблемой общественного здравоохранения, из-за которой ежегодно погибает более 250000 человек по всему миру, и которая при этом создает экономическое бремя для миллионов людей. Пандемический грипп, который возникает в случае появления нового вируса и инфицирует людей со слабым иммунитетом или без иммунитета по всему миру, представляет собой еще большую угрозу для здоровья человека; например, в 1918 г. пандемический "испанский грипп" стал причиной примерно 50 миллионов смертей. По-прежнему вызывает беспокойство высокопатогенный птичий грипп (HPAI), который продемонстрировал уровни смертности, составляющие более 50% у инфицированных людей. Вирусы гриппа подтипа H5, а также H7 являются эндемическими для домашней птицы в некоторых частях мира. В настоящее время эти вирусы, вероятно, не способны легко передаваться от человека к человеку, однако новые данные касательно вируса птичьего гриппа H5 указывают на то, что достаточно лишь нескольких аминокислотных изменений для того, чтобы стало возможным распространение данного вируса посредством аэрозольной передачи в модельной системе *in vivo* млекопитающих.

Недавно были описаны антитела, которые обладают нейтрализующей способностью в отношении широкого спектра вирусов гриппа А и/или В, такие как CR9114 (как раскрыто в WO 2013/007770), CR6261 (раскрыты в WO 2008/028946), F16 (описанные в Corti et al., Science 333, 850-856 (2011)). Было показано, что эти антитела взаимодействуют с целым рядом белков-гемагглютининов и нейтрализуют широкий спектр штаммов гриппа. Вследствие их эффективности и широты спектра действия такие антитела теперь разрабатываются для терапевтического лечения тяжелобольных пациентов и профилактических применений у людей, принадлежащих к группам высокого риска. Тем не менее, ожидается, что относительно высокая стоимость продуктов и их парентеральное введение будут ограничивать применение моноклональных антител у более широких слоев населения.

Другие доступные в настоящее время средства для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа, также связаны с серьезными ограничениями. Такие противовирусные лекарственные средства, как ингибиторы нейраминидазы, осельтамивир и занамивир, и ингибиторы M2, амантадин и римантадин, имеют ограниченную эффективность при их введении на поздних стадиях инфекции, а их широкое применение, вероятно, приведет к появлению устойчивых штаммов вируса. Кроме того, применение осельтамивира у взрослых связано с побочными действиями, такими как тошнота, рвота, эффекты в отношении психического здоровья и явления, связанные с почками.

Кроме того, было продемонстрировано, что эффективность вакцин против гриппа является субоптимальной для пациентов в группе высокого риска (пожилые люди), а в связи с постоянными изменениями антигенов у циркулирующих вирусов гриппа необходима ежегодная адаптация состава вакцины против гриппа для обеспечения максимально возможного соответствия между штаммами вируса в вакцине против гриппа и циркулирующими штаммами вируса гриппа.

Поиск новых противовирусных препаратов против гриппа, воздействующих на гемагглютинин (HA), в качестве альтернативной стратегии предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа, также осложняется большой вариабельностью последовательности этого белка. Поэтому описанные к настоящему моменту лиганды гемагглютинина проявляют активность только против ограниченного числа близкородственных штаммов вируса гриппа.

Учитывая тяжесть респираторного заболевания, вызываемого вирусами гриппа А, а также сильное воздействие на экономику сезонных эпидемий и постоянный риск пандемий, все еще существует потребность в новых эффективных ингибиторах с широким спектром активности в отношении вирусов гриппа А, и которые можно применять в качестве лекарственных препаратов для предупреждения или лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены новые соединения-пептидомиметики, которые могут специфически связываться с гемагглютинином (HA) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, содержащих HA различных подтипов из филогенетической группы 1. В определенных вариантах осуществления соединения могут специфически связываться по меньшей мере с одним штаммом вируса гриппа, содержащим HA подтипа H1, таким как штамм H1N1 вируса гриппа, и по меньшей мере с одним штаммом вируса гриппа, содержащим HA подтипа H5, таким как штамм H5N1 вируса гриппа. По меньшей мере, некоторые из этих соединений могут нейтрализовать по меньшей мере два штамма вируса гриппа А, содержащих HA различных подтипов из филогенетической группы 1. В определенных вариантах осуществления соединения могут специфически нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа, содержащий HA подтипа H1, такой как штамм H1N1 вируса гриппа, и по меньшей мере один

штамм вируса гриппа, содержащий НА подтипа H5, такой как штамм H5N1 вируса гриппа.

В определенных вариантах осуществления соединения имеют следующую последовательность:

Cap1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10-Cap2,

где Cap1 представляет собой любую аминокислотную последовательность, состоящую из 0-10 остатков с N-концевой блокирующей группой;

X1 представляет собой любую L- или D-аминокислоту;

X2 представляет собой любую L-аминокислоту;

X3 представляет собой алифатическую L-аминокислоту с молекулярной массой менее 200 Да;

X4 представляет собой любую L-аминокислоту;

X5 представляет собой Tyr или аналог L-тирозина;

X6 представляет собой Phe или аналог L-фенилаланина;

X7 представляет собой любую заряженную или нейтральную гидрофильную L-аминокислоту;

X8 представляет собой Trp или аналог L-триптофана;

X9 отсутствует или представляет собой любую гидрофильную L-аминокислоту;

X10 представляет собой любую L-аминокислоту; и

Cap2 представляет собой любую аминокислотную последовательность, состоящую из 0-10 остатков с C-концевой блокирующей группой.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены циклизированные соединения-пептидомиметики. Таким образом, в определенных вариантах осуществления соединения имеют последовательность, выбранную из

Cap1-X1-[X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10]-Cap2,



Cap1-X1-X2-X3-[X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10]-Cap2



и

Cap1-X1-[X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10]-Cap2,



где Cap1 представляет собой любую аминокислотную последовательность, состоящую из 0-10 остатков с N-концевой блокирующей группой;

X1 представляет собой любую L- или D-аминокислоту;

X2 представляет собой любую L-аминокислоту;

X3 представляет собой алифатическую L-аминокислоту с молекулярной массой менее 200 Да;

X4 представляет собой любую L-аминокислоту;

X5 представляет собой Tyr или аналог L-тирозина;

X6 представляет собой Phe или аналог L-фенилаланина;

X7 представляет собой любую заряженную или нейтральную гидрофильную L-аминокислоту;

X8 представляет собой Trp или аналог L-триптофана;

X9 отсутствует или представляет собой любую гидрофильную L-аминокислоту;

X10 представляет собой любую L-аминокислоту; и

Cap2 представляет собой любую аминокислотную последовательность, состоящую из 0-10 остатков с C-концевой блокирующей группой.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены мультимерные, в частности димерные, соединения-пептидомиметики. Таким образом, в определенных вариантах осуществления соединения имеют последовательность

Cap1-X1-[X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10]-Cap2



Cap1-X1-[X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10]-Cap2



где Cap1 представляет собой любую аминокислотную последовательность, состоящую из 0-10 остатков с N-концевой блокирующей группой;

X1 представляет собой любую L- или D-аминокислоту;

X2 представляет собой любую L-аминокислоту;

X3 представляет собой алифатическую L-аминокислоту с молекулярной массой менее 200 Да;

X4 представляет собой любую L-аминокислоту;

X5 представляет собой Tyr или аналог L-тирозина;

X6 представляет собой Phe или аналог L-фенилаланина;

X7 представляет собой любую заряженную или нейтральную гидрофильную L-аминокислоту;

X8 представляет собой Trp или аналог L-триптофана;

X9 отсутствует или представляет собой любую гидрофильную L-аминокислоту;

X10 представляет собой любую L-аминокислоту; и

Cap2 представляет собой любую аминокислотную последовательность, состоящую из 0-10 остатков с C-концевой блокирующей группой.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно соединение, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Настоящее изобретение также относится к описанным в данном документе соединениям для применения в диагностике, предупреждении и/или лечении гриппа.

Краткое описание фигур

На чертеже представлены кривые связывания CP141037, CP141019 и CP141099 с НА, полученным из трех штаммов вируса гриппа (A/California/07/09 (слева), A/New Caledonia/20/99 (посередине), A/Vietnam/1194/04 (справа)). Единицы ответа (RU) нанесены на график в виде зависимости от времени после инъекции возрастающего количества соединения. Кривые представляют собой осциллограмму, полученную в ходе SPR-экспериментов, а наложенные тонкие черные линии представляет собой кривые, полученные методом наилучшего приближения к данным согласно модели связывания Ленгмюра 1:1.

Подробное описание изобретения

В исследовании, которое привело к созданию настоящего изобретения, были разработаны новые соединения-пептидомиметики, при создании которых руководствовались структурными данными комплексов НА, в частности, с моноклональными антителами CR6261, CR9114 и FI6. Соединения-пептидомиметики (также называемые "пептидомиметиками") обычно представляют собой небольшие близкие к белкам молекулы, сконструированные для имитации природных пептидов или белков. Пептидомиметики предпочтительно обладают способностью связываться с их природными мишенями таким же образом, как связываются природные пептиды, и, как следствие, они должны оказывать такой же биологический эффект. Дополнительно можно сконструировать эти молекулы таким образом, чтобы они проявляли такой же биологический эффект, что и природный пептид, но с улучшенными свойствами, такими как более высокая протеолитическая стабильность, биодоступность, избирательность и/или эффективность.

Было показано, что соединения-пептидомиметики по настоящему изобретению обладают активностью конкурентного связывания, по меньшей мере, в отношении НА подтипа H1, как, например, штаммов A/California/07/2009 и A/New Caledonia/20/1999 вируса гриппа H1N1, и в отношении НА подтипа H5, как, например, штамма A/Vietnam/1203/2004 вируса гриппа H5N1. Также было показано, что, по меньшей мере, некоторые из соединений по настоящему изобретению обладают нейтрализующей активностью в отношении по меньшей мере двух различных штаммов вируса гриппа А, каждый из которых содержит НА отдельного подтипа НА из филогенетической группы 1, как, например, в отношении вирусов гриппа, содержащих НА подтипа H1, таких как штаммы A/California/07/2009 и A/New Caledonia/20/1999 вируса гриппа H1N1, и в отношении вируса гриппа, содержащего НА подтипа H5, такого как штамм A/Vietnam/1203/2004 вируса гриппа H5N1. Соединения по настоящему изобретению предоставляют несколько преимуществ по сравнению с антителами к вирусу гриппа, в том числе они характеризуются малым размером (1,5 кДа), низкой себестоимостью химического получения, простым конструированием в многомерные форматы и высокой стабильностью с возможностью обеспечения неинъекционных путей введения.

Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения предусмотрены новые соединения-пептидомиметики, имеющие следующую последовательность:

Cap1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10-Cap2,

где Cap1 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую 0-10 остатков, с N-концевой блокирующей группой;

X1 представляет собой любую L- или D-аминокислоту;

X2 представляет собой любую L-аминокислоту;

X3 представляет собой алифатическую L-аминокислоту с молекулярной массой менее 200 Да;

X4 представляет собой любую L-аминокислоту;

X5 представляет собой Tug или аналог L-тирозина;

X6 представляет собой Phe или аналог L-фенилаланина;

X7 представляет собой любую заряженную или нейтральную гидрофильную L-аминокислоту;

X8 представляет собой Trp или аналог L-триптофана;

X9 отсутствует или представляет собой любую гидрофильную L-аминокислоту;

X10 представляет собой любую L-аминокислоту; и

Cap2 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую 0-10 остатков, с C-концевой блокирующей группой.

Как указано выше, соединения по настоящему изобретению могут специфически связываться с ге-

магглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, содержащих НА различных подтипов из филогенетической группы 1. В определенных вариантах осуществления соединения могут специфически связываться по меньшей мере с одним штаммом вируса гриппа, содержащим НА подтипа Н1, таким как штамм Н1Н1 вируса гриппа, и по меньшей мере с одним штаммом вируса гриппа, содержащим НА подтипа Н5, таким как штамм Н5Н1 вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления соединения могут специфически связываться по меньшей мере с одним штаммом вируса гриппа, содержащим НА подтипа Н1, таким как штамм Н1Н1 вируса гриппа, и по меньшей мере с одним штаммом вируса гриппа, содержащим НА подтипа Н5, таким как штамм Н5Н1 вируса гриппа.

В определенных вариантах осуществления соединения могут специфически связываться по меньшей мере с двумя, предпочтительно по меньшей мере с тремя, более предпочтительно по меньшей мере с четырьмя различными штаммами вируса гриппа, содержащими НА подтипа Н1. В определенных вариантах осуществления соединения могут специфически связываться по меньшей мере с двумя, предпочтительно по меньшей мере с тремя, более предпочтительно по меньшей мере с четырьмя различными штаммами вируса гриппа, содержащими НА подтипа Н5. В определенных вариантах осуществления соединения могут нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, более предпочтительно по меньшей мере четыре различных штамма вируса гриппа, содержащих НА подтипа Н1.

В определенных вариантах осуществления соединения могут связываться по меньшей мере с одним вирусом гриппа, содержащим НА другого подтипа из филогенетической группы 1, такого как подтип Н2 и/или Н9.

Применяемый в данном документе термин "специфическое связывание" относится к соединениям, которые связываются с эпитопом представляющего интерес белка, т.е. НА, но которые практически не распознают и не связывают другие молекулы в образце, содержащем смесь антигенных биологических молекул. Как правило, соединения по настоящему изобретению связываются с НА вируса гриппа А группы 1 при константе аффинности (значение K_d) ниже 10 мкМ, предпочтительно ниже 1 мкМ, более предпочтительно ниже 0,1 мкМ, еще более предпочтительно ниже 10 нМ, еще более предпочтительно ниже 1 нМ.

Применяемый на всем протяжении данного описания термин "подтип вируса гриппа" в отношении вирусов гриппа А относится к штаммам вируса гриппа А, которые характеризуются различными комбинациями вирусных поверхностных белков, гемагглютинина (Н) и нейраминидазы (N). Подтипы вируса гриппа А можно называть по номеру их Н, как, например, "вирус гриппа, содержащий НА подтипа Н1 или Н5" или "вирус гриппа Н1", "вирус гриппа Н5", или по комбинации номера Н и номера N, как, например, "подтип Н1Н1 вируса гриппа" или "Н5Н1". Термин "подтип" вируса гриппа включает, в частности, все отдельные "штаммы" вируса гриппа в пределах такого подтипа, которые обычно различаются вследствие мутаций в гемагглютинине и/или нейраминидазе, и характеризуются различными профилями патогенности, и включает природные изоляты, а также искусственные мутанты или реассортанты и т.п. Такие штаммы также можно называть различными "изолятами" подтипа вируса. Соответственно, применяемые в данном документе термины "штаммы" и "изоляты" можно использовать взаимозаменяемо. Подтипы вируса гриппа А можно дополнительно классифицировать с учетом их филогенетической группы. Таким образом, филогенетический анализ показал, что гемагглютинины вируса гриппа подразделяются на две основные группы: в частности, подтипы Н1, Н2, Н5 и Н9 принадлежат к филогенетической группе 1 (вирусы гриппа "группы 1"), а, в частности, подтипы Н3, Н4, Н7 и Н10 принадлежат к филогенетической группе 2 (вирусы гриппа "группы 2").

Аминокислота согласно настоящему изобретению может быть любой из двадцати встречающихся в природе (или "стандартных" аминокислот) или их вариантов, таких как, например, D-аминокислоты (D-энантиомеры аминокислот с хиральным центром) или любые варианты, которые в природе не встречаются в белках. В табл. 5 приведены сокращения и свойства стандартных аминокислот.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения X3 представляет собой алифатическую L-аминокислоту с молекулярной массой менее 200 Да с линейной или C-γ-разветвленной боковой цепью; X5 представляет собой Туг или аналог L-тирозина, имеющий донорную и/или акцепторную водородную связь, заменяющую гидроксильную группу тирозина; X6 представляет собой Phe или аналог L-фенилаланина с одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из водорода, галогена, C₁-C₄-алкила в орто- и/или мета-положениях фенильного кольца, галогена в пара-положении фенильного кольца, L-3-нафталин-1-ил-аланина и L-3-нафталин-2-ил-аланина; и X8 представляет собой Trp или аналог L-триптофана с галогеном, который выступает заместителем при C5, C6 и/или C7, и/или небольшим алифатическим заместителем при C2 индольного кольца.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрены циклические соединения. Циклизация снижает гибкость соединений и приводит к более высокой аффинности и эффективности, а также к улучшенным свойствам, таким как более высокая протеолитическая стабильность, биодоступность и/или избирательность. Таким образом, в определенных вариантах осуществления соединения, описываемые в данном документе, циклизированы. В определенных вариантах осуществления соединения циклизированы посредством химического мостика между остатками X2 и X10 и/или между остатками X4 и

X10. В определенных вариантах осуществления соединения циклизированы посредством образования амидной связи, включающей остатки X2 и X10. В определенных вариантах осуществления соединения циклизированы посредством образования амидной связи, включающей остатки X4 и X10.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления соединения имеют последовательность, выбранную из группы, состоящей из

Cap1-X1-[X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10]-Cap2 ,



Cap1-X1-X2-X3-[X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10]-Cap2



и

Cap1-X1-[X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10]-Cap2 ,



где Cap1 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую 0-10 остатков, с N-концевой блокирующей группой;

X1 представляет собой любую L- или D-аминокислоту;

X2 представляет собой любую L-аминокислоту;

X3 представляет собой алифатическую L-аминокислоту с молекулярной массой менее 200 Да;

X4 представляет собой любую L-аминокислоту;

X5 представляет собой Tyr или аналог L-тирозина;

X6 представляет собой Phe или аналог L-фенилаланина;

X7 представляет собой любую заряженную или нейтральную гидрофильную L-аминокислоту;

X8 представляет собой Trp или аналог L-триптофана;

X9 отсутствует или представляет собой любую гидрофильную L-аминокислоту;

X10 представляет собой любую L-аминокислоту; и

Cap2 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую 0-10 остатков, с C-концевой блокирующей группой.

В определенных вариантах осуществления X2 и/или X4 представляют собой любую L-аминокислоту с функциональной группой, которая может быть использована для циклизации, причем функциональная группа находится на расстоянии 2-5 атомов от α-атома C в L-аминокислоте; и X10 представляет собой любую L-аминокислоту с функциональной группой, которая может быть использована для циклизации, причем функциональная группа находится на расстоянии 2-5 атомов от α-атома C в L-аминокислоте.

В определенных вариантах осуществления X2 представляет собой Lys или L-орнитин, а X10 представляет собой β-аланин, 3-аминопропионовую кислоту, 3-амино-2,2-диметилпропионовую кислоту, 4-аминобутановую кислоту, 5-аминопентановую кислоту, 6-аминогексановую кислоту или Pro.

В определенных вариантах осуществления X2 представляет собой Asp или Glu, а X10 представляет собой Lys или L-орнитин.

В определенных вариантах осуществления X4 представляет собой Lys или L-орнитин, а X10 представляет собой β-аланин, 3-аминопропионовую кислоту, 3-амино-2,2-диметилпропионовую кислоту, 4-аминобутановую кислоту, 5-аминопентановую кислоту, 6-аминогексановую кислоту или Pro.

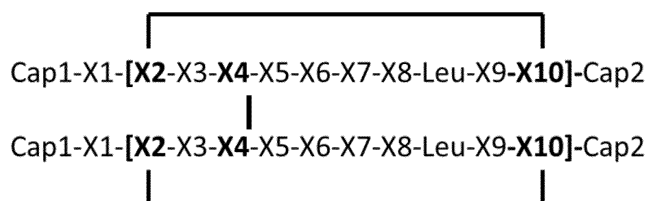
В определенных вариантах осуществления X4 представляет собой Asp или Glu, а X10 представляет собой Lys или L-орнитин.

В определенных вариантах осуществления соединения циклизированы посредством химического мостика между остатками X2 и X10, а также X4 и X10.

В определенных вариантах осуществления соединения циклизированы в результате внутримолекулярного сшивания свободных аминогрупп, введенных в остатки X2, и X4, и X10, с помощью трисукцинимидиламинотриацетата (TSAT).

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены мультимерные соединения-пептидомиметики, где мультимерные соединения содержат два или более соединения, описываемых в данном документе. В определенных вариантах осуществления соединения являются димерными. В определенных вариантах осуществления остаток, вовлеченный в образование связи между мономерами, находится в положении X4. Таким образом, в определенных вариантах осуществления соединения мультимеризированы за счет межмолекулярного сшивания реакционноспособных групп, введенных в остаток X4. Соединения по настоящему изобретению могут быть гомодимерами (т.е. содержащими два аналогичных мономерных соединения) или могут быть гетеродимерами.

В определенных вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению имеют последовательность



где Cap1, X1-X10 и Cap2 являются такими, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления соединения димеризованы за счет межмолекулярного сшивания реакционноспособных групп, введенных в остаток X4, с помощью линкера, состоящего из 2-20 повторяющихся этиленгликолевых звеньев.

Как определено выше, в линейных, циклизированных и/или мультимерных соединениях по настоящему изобретению Cap1 и/или Cap2 могут представлять собой аминокислотную последовательность, состоящую из 0-10 дополнительных остатков. Таким образом, согласно настоящему изобретению Cap1 и/или Cap2 могут отсутствовать, или у сердцевинных последовательностей, приводимых в данном документе, на N-концевом участке может присутствовать аминокислотная последовательность, содержащая до 10 дополнительных остатков (природных или неприродных аминокислот), и/или на C-концевом участке может присутствовать последовательность, содержащая до 10 дополнительных остатков (природных или неприродных аминокислот). C- и/или N-концевая блокирующая группа может представлять собой любую произвольную блокирующую группу, которая известна из уровня техники. N-концевыми блокирующими группами являются, например, ацетил или сукцинил. C-концевой блокирующей группой является, например, карбоксамид.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил или сукцинил.

Как определено выше, согласно настоящему изобретению, X1 может представлять собой любую L- или D-аминокислоту. В определенных вариантах осуществления X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту, (2S)-3,3-диметил-2-амино-5-фенилпентановую кислоту или Arg.

В определенных вариантах осуществления X2 представляет собой Lys, L-орнитин, Cys, L-гомоцистеин или Ser.

В определенных вариантах осуществления X3 представляет собой Leu, L-норлейцин, L-циклопентилаланин, L-циклобутилаланин, L-циклопропилаланин, (2S,4S)-2-амино-4-метилгексановую кислоту, (2S,4R)-2-амино-4-метилгексановую кислоту, (2S,4S)-2-амино-4-метилгептановую кислоту, (2S,4R)-2-амино-4-метилгептановую кислоту, (S)-2-амино-4-этилгексановую кислоту или их N-метилированное производное.

В определенных вариантах осуществления X4 представляет собой Asp, Glu, Arg, Lys, орнитин, цистеин, гомоцистеин, N6-(4-карбоксибутаноил)лизин или N5-(4-карбоксибутаноил)орнитин.

В определенных вариантах осуществления X5 представляет собой Trp.

В определенных вариантах осуществления X6 представляет собой Phe, L-2-хлорфенилаланин, L-3-хлорфенилаланин, L-4-хлорфенилаланин или L-3,4-дихлорфенилаланин.

Как определено выше, X7 может представлять собой любую заряженную или нейтральную гидрофильную L-аминокислоту. В определенных вариантах осуществления X7 представляет собой Glu, Gln, Asp, Asn, Arg или Lys.

В определенных вариантах осуществления X8 представляет собой Trp или L-2-метилтриптофан.

Как определено выше, согласно настоящему изобретению X9 может отсутствовать или может представлять собой любую гидрофильную L-аминокислоту. В определенных вариантах осуществления X9 представляет собой Ser или Gln.

Как определено выше, согласно настоящему изобретению X10 может представлять собой любую L-аминокислоту. В определенных вариантах осуществления X10 представляет собой 4-аминобутановую кислоту, β-аланин, ((2R)-3-амино-2-(3-аминопропаноиламино)-β-аланин, Lys, L-орнитин, Cys или гомоцистеин.

В определенных вариантах осуществления Cap2 отсутствует.

По меньшей мере, в определенных вариантах осуществления соединения могут нейтрализовать по меньшей мере два штамма вируса гриппа А, содержащих HA различных подтипов из филогенетической группы 1. В определенных вариантах осуществления соединения могут специфически нейтрализовать по меньшей мере один штамм вируса гриппа, содержащий HA подтипа H1, такой как штамм H1N1 вируса гриппа, и по меньшей мере один штамм вируса гриппа, содержащий HA подтипа H5, такой как штамм H5N1 вируса гриппа.

В определенных вариантах осуществления соединения могут нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, более предпочтительно по меньшей мере четыре различных штамма вируса гриппа, содержащих HA подтипа H1. В определенных вариантах осуществления соединения могут нейтрализовать по меньшей мере два, предпочтительно по меньшей мере три, более предпочтительно по меньшей мере четыре различных штамма вируса гриппа, содержащих HA подтипа H5.

В определенных вариантах осуществления соединения могут нейтрализовать по меньшей мере один вирус гриппа, содержащий НА другого подтипа из филогенетической группы 1, такого как подтип H2 и/или H9. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены перекрестно-нейтрализующие соединения.

Термин "нейтрализующие" или "нейтрализация", применяемый в данном документе в отношении соединений по настоящему изобретению, относится к способности соединения подавлять репликацию вируса гриппа *in vitro* и/или *in vivo* у субъекта, независимо от механизма, с помощью которого достигается нейтрализация. В определенных вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению нейтрализуют вирус гриппа путем подавления слияния вирусной оболочки и клеточной мембраны после прикрепления вируса к целевой клетке. Термин "перекрестно-нейтрализующие" или "перекрестная нейтрализация", применяемый в данном документе в отношении соединений по настоящему изобретению, относится к способности нейтрализовать штаммы вируса гриппа различных подтипов гриппа А. Нейтрализующую активность можно измерять, например, как описано в данном документе. Альтернативные анализы, с помощью которых измеряют нейтрализующую активность, описаны, например, в WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva: World Health Organisation, 2005, version 2002.5. Как правило, соединения по настоящему изобретению обладают нейтрализующей активностью, составляющей 1 мкМ или меньше, предпочтительно 100 нМ или меньше, более предпочтительно 10 нМ или меньше, как определено в анализе нейтрализации вируса (VNA) *in vitro*, например, как описано в примерах.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой лейцин; X4 представляет собой аргинин; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой фенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой серин; X10 представляет собой β-аланин; и Cap2 отсутствует, где соединение циклизировано посредством амидной связи между остатком X2 и X10 (образование лактама от боковой цепи X2 к хвосту).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой лейцин; X4 представляет собой глутаминовую кислоту; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой L-3,4-дихлорфенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой серин; X10 представляет собой β-аланин; и Cap2 отсутствует, где соединение циклизировано посредством амидной связи между X2 и X10 (образование лактама от боковой цепи X2 к хвосту).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой L-циклопентилаланин; X4 представляет собой глутаминовую кислоту; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой фенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой серин; X10 представляет собой β-аланин; и Cap2 отсутствует, где соединение циклизировано посредством амидной связи между X2 и X10 (образование лактама от боковой цепи X2 к хвосту).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой L-N-метиллейцин; X4 представляет собой глутаминовую кислоту; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой фенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой серин; X10 представляет собой β-аланин; и Cap2 отсутствует, где соединение циклизировано посредством амидной связи между X2 и X10 (образование лактама от боковой цепи X2 к хвосту).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой лейцин; X4 представляет собой N⁶-(4-карбоксибутаноил)лизин; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой фенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой серин; X10 представляет собой β-аланин; и Cap2 отсутствует, где соединение является циклизировано посредством амидной связи между X2 и X10 (образование лактама от боковой цепи X2 к хвосту).

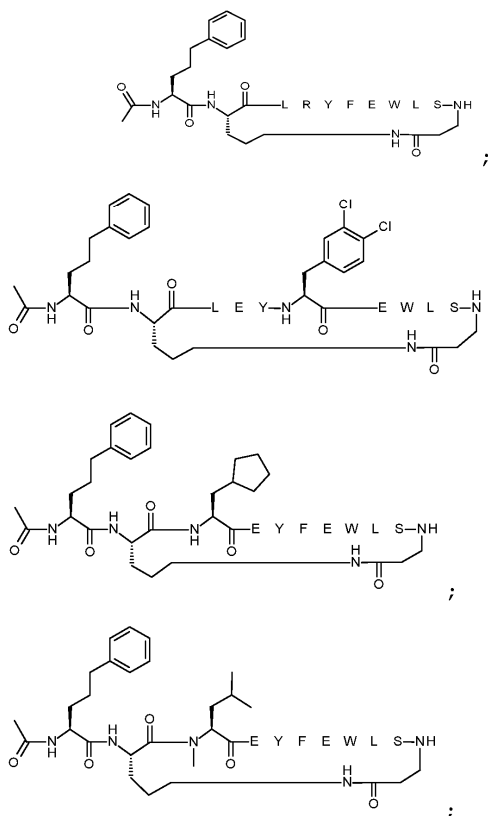
В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой лейцин; X4 представляет собой глутаминовую кислоту; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой фенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой глутамин; X10 представляет собой β-аланин; и Cap2 отсутствует, где соединение циклизировано посредством амидной связи между X2 и X10 (образование лактама от боковой цепи X2 к хвосту).

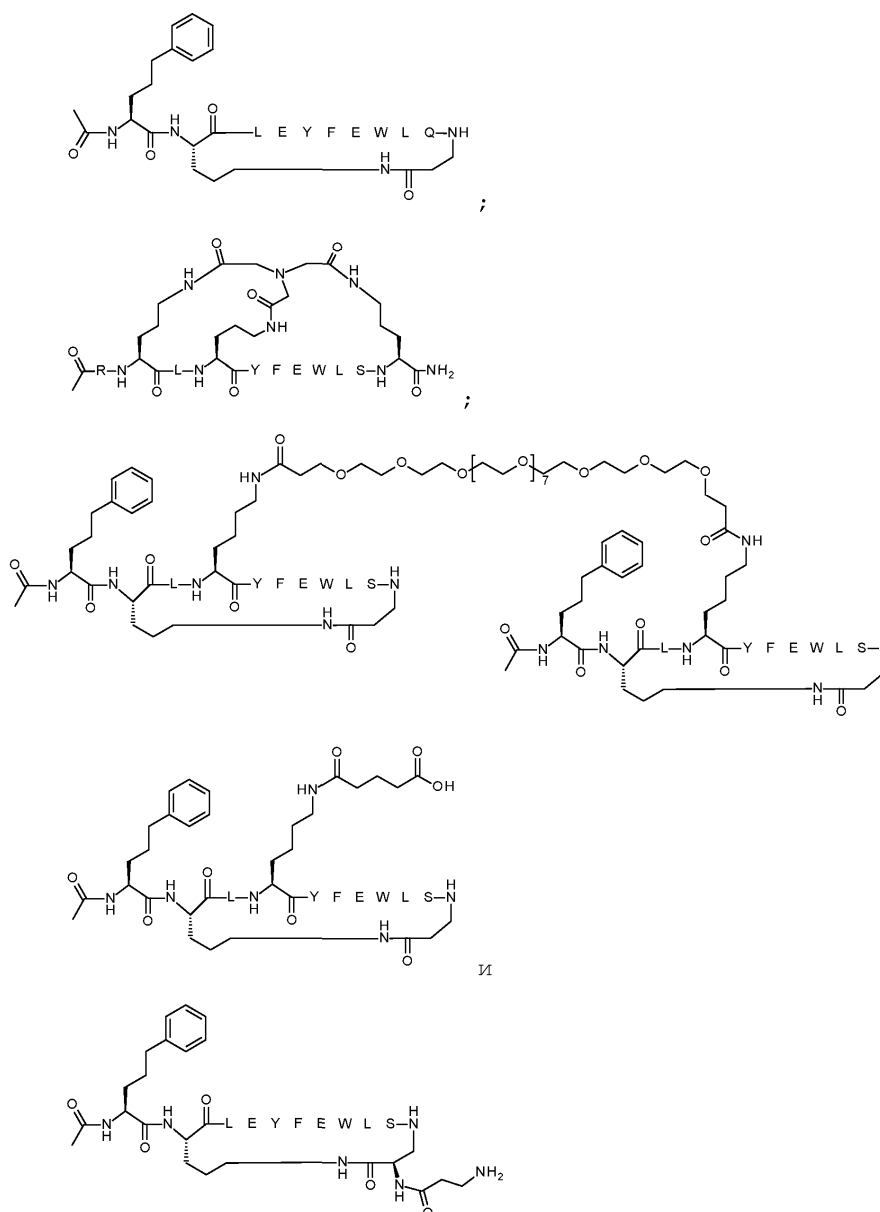
В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой лейцин; X4 представляет собой N⁶-(4-карбоксибутаноил)лизин; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой фенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой серин; X10 представляет собой β-аланин; и Cap2 отсутствует, где соединение циклизировано посредством образования внутримолекулярной связи от боковой цепи X2 к хвосту и димеризованным посредством соединенной амидной связи с X4 полиэтиленгликолевого спейсера, содержащего 13 этиленовых звеньев (PEG13).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой лейцин; X4 представляет собой глутаминовую кислоту; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой фенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой серин; X10 представляет собой ((2R)-3-амино-2-(3-аминопропаноиламино)-β-аланин; и Cap2 отсутствует, где соединение циклизировано посредством амидной связи между X2 и X10 (образование лактама от боковой цепи X2 к хвосту).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Cap1 представляет собой ацетил; X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту; X2 представляет собой L-орнитин; X3 представляет собой лейцин; X4 представляет собой L-орнитин; X5 представляет собой тирозин; X6 представляет собой фенилаланин; X7 представляет собой глутаминовую кислоту; X8 представляет собой триптофан; X9 представляет собой серин; X10 представляет собой L-орнитин, и Cap2 представляет собой карбоксамид, где соединение циклизировано за счет TSAT (трис-сукцинимидил)аминотриацетат)-опосредованной связи X2, X4 и X10.

В определенных вариантах осуществления соединения имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из





Соединения-пептидомиметики по настоящему изобретению можно получить с помощью любой процедуры, хорошо известной в данной области техники, в частности с помощью общеизвестных процедур химического синтеза с использованием автоматизированных синтезаторов для твердофазного синтеза пептидов с последующей хроматографической очисткой, например, как описано в приведенных ниже примерах.

Дополнительно в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько соединений, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. "Фармацевтически приемлемым наполнителем" может быть любое инертное вещество, которое объединяют с активной молекулой, такой как соединение в соответствии с настоящим изобретением, для получения подходящей композиции. Фармацевтически приемлемый наполнитель представляет собой наполнитель, который при применяемых дозах и концентрациях является нетоксичным для пациентов, и который совместим с другими ингредиентами состава. Фармацевтически приемлемые наполнители широко применяются и известны из уровня техники. Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут дополнительно содержать по меньшей мере одно другое терапевтическое, профилактическое и/или диагностическое средство. Указанные дополнительные терапевтические и/или профилактические средства, например, могут представлять собой средства, которые также могут обеспечивать предупреждение и/или лечение инфекции, вызванной вирусом гриппа, такие как, например, ингибиторы M2 (например, амантидин, римантадин) и/или ингибиторы нейраминидазы (например, занамивир, осельтамивир). Их можно применять в комбинации с соединениями по настоящему изобретению. Выражение "в комбинации" в данном документе означает одновременно в виде отдельных составов или в виде одного комбинированного состава или в соответствии со схемой последовательного введения в виде отдельных составов в любом порядке.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрены описанные в данном документе соединения для применения в диагностике, предупреждении и/или лечении гриппа. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрено применение соединения, описанного в данном документе, в изготовлении лекарственного препарата для диагностики, предупреждения и/или лечения гриппа. Применяемые в данном документе термины "грипп" или "заболевание, вызванное вирусом гриппа" относятся к патологическому состоянию, возникающему в результате инфицирования клетки или субъекта вирусом гриппа. В конкретных вариантах осуществления данный термин относится к заболеванию дыхательных путей, причиной которого является вирус гриппа. Применяемый в данном документе термин "инфекция, вызванная вирусом гриппа" означает заражение, размножение и/или наличие вируса гриппа в клетке или у субъекта. Инфекции, вызванные вирусом гриппа, могут возникать у небольших групп населения, но также могут распространяться по всему миру во время сезонных эпидемий или, что хуже, во время глобальных пандемий, при которых риску подвергаются миллионы людей. В настоящем изобретении предусмотрены связывающие молекулы, которые способны нейтрализовать инфекцию, вызванную штаммами вируса гриппа, которые являются причиной таких сезонных эпидемий, а также возможных пандемий.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы предупреждения и/или лечения гриппа у субъекта, предусматривающие введение терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения, определенного в данном документе, которое является эффективным для предупреждения, облегчения и/или лечения состояния, являющегося результатом инфицирования вирусом гриппа. Предупреждение и/или лечение могут быть нацелены на группы пациентов, которые являются восприимчивыми к инфицированию гриппом. Такие группы пациентов включают без ограничения, например, пожилых (например, в возрасте ≥ 50 лет, в возрасте ≥ 60 лет и предпочтительно в возрасте ≥ 65 лет), юных (например, в возрасте ≤ 5 лет, в возрасте ≤ 1 года), госпитализированных пациентов и уже инфицированных пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, однако у которых наблюдался неудовлетворительный противовирусный ответ.

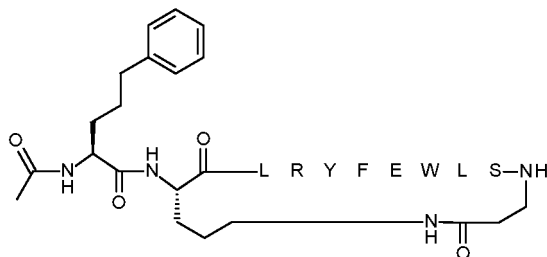
Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно вводить субъекту, например, внутривенно, интраназально, посредством пероральной ингаляции, легочным путем, подкожно, внутривенно, интравитреально, перорально, внутримышечно и т.д. На оптимальный путь введения будут влиять несколько факторов, включая физико-химические свойства активных молекул, неотложность клинической ситуации и взаимосвязь концентраций активных молекул в плазме крови с требуемым терапевтическим эффектом.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ выявления вируса гриппа А в образце, где способ предусматривает стадии а) приведения указанного образца в контакт с диагностически эффективным количеством соединения в соответствии с настоящим изобретением и б) определения того, связывается ли соединение специфично с молекулой в образце. Образец может представлять собой биологический образец, в том числе без ограничения кровь, сыворотку крови, ткань или другой биологический материал от (потенциально) инфицированных субъектов. (Потенциально) инфицированные субъекты могут представлять собой субъектов-людей, однако животных, которые предположительно являются носителями вируса гриппа, также можно подвергать тестированию на наличие вируса гриппа с применением соединений по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными далее неограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1. Синтез CP132070



Линейный пептид-предшественник получали вручную путем твердофазного синтеза пептидов с использованием Fmoc-групп в масштабе 0,5 ммоль с применением предварительно нагруженной β-аланином 2-хлортритилхлоридной смолы (0,685 ммоль/г). Функциональные группы боковых цепей аминокислот блокировали защитными группами, такими как N-Boc (W), O-трет-Bu (E, S, Y) и N-Pbf (R). Группу N-Dde использовали для ортогональной защиты функциональной аминогруппы боковой цепи орнитина (Boc: трет-бутоксикарбонил, трет-Bu: трет-бутил, Dde: 1-(4,4-диметил-2,6-диоксациклогексиден)этил, Fmoc: 9-фторенилметоксикарбонил, Pbf: 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил). Перед присоединением первой аминокислоты смолу замачивали в DMF (диметилформамиде) в течение 1 ч. Использовали протокол связывания с применением 3

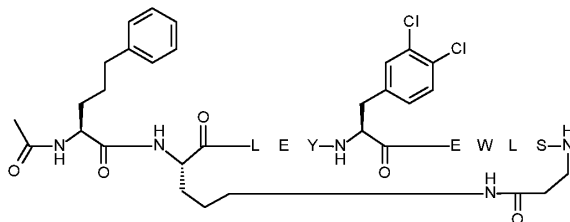
экв. каждой Fmoc-аминокислоты в DMF (4 мл) и активирующей смеси, содержащей HBTU ((2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия гексафторфосфат, 2,85 экв.) и DIPEA (N,N-диизопропилэтиламин, 6 экв.) в DMF (4 мл). Реакционную смесь встряхивали в течение 1,5-2 ч. Удаление Fmoc-группы проводили с помощью 20% раствора пиперидина в DMF (2×15 мин.). N-концевое ацетилирование проводили на конце пептидной сборки путем обработки комплекса пептида и смолы смесью уксусного ангидрида и 4-метилморфолина в DMF (2:1:17, об./об./об., 20 мл) при комнатной температуре в течение 1 ч. Наконец, защитную группу N-Dde избирательно удаляли путем обработки комплекса пептида и смолы 3% раствором гидрата гидразина в DMF (3×10 мин.).

Пептид с удаленной защитной группой с боковой цепи орнитина отщепляли от смолы путем взбалтывания комплекса пептида и смолы в течение 60 мин в смеси 65% (об.) DCM (дихлорметан), 20% (об.) гексафторизопропанола, 10% (об.) трифторэтанола и 5% (об.) триэтилсилана (10 мл/г комплекса пептида и смолы). Смолу отфильтровывали и промывали с помощью DCM. Пептид осаждали из фильтрата путем добавления холодного простого изопропилового эфира и сушили под вакуумом. Неочищенный пептид применяли без дополнительной очистки на последующем этапе циклизации в лактам.

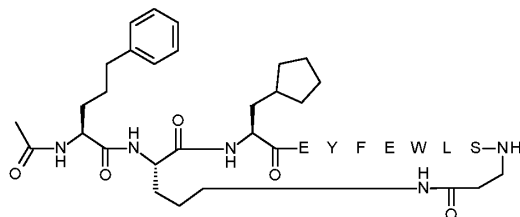
Циклизацию в лактам проводили при высоком разведении путем растворения пептида с удаленной защитной группой с боковой цепи орнитина и C-концевой карбоксильной группы в 150 мл DMF, к которому добавляли по каплям раствор PyBOP (бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония гексафторфосфат, 2 экв.) и N-метилморфолина (6 экв.) в DMF (90 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока не наблюдали полное превращение. После удаления растворителя при пониженном давлении получали циклизированный пептид, у которого удаляли все защитные группы путем обработки смесью 90% (об.) TFA (трифторуксусная кислота), 5% (об.) тиоанизола, 2,5% (об.) H₂O и 2,5% (об.) EDT (этандитиол) при комнатной температуре в течение 3 ч. Осаждение с последующей промывкой ледяным простым диэтиловым эфиром давало неочищенный пептид, который очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC) на колонке для препаративной HPLC Luna C18 (25×200 мм, 10 мкм, 100 Å) вместе с колонкой для препаративной HPLC Gemini C18 (30×150 мм, 50 мкм, 100 Å) со скоростью потока подвижной фазы 20 мл/мин, (подвижная фаза A: 0,05% TFA в воде, подвижная фаза B: CH₃CN, применяли линейный градиент). Лиофилизация чистых фракций давала 328 мг (выход: 53%, чистота: 97%) циклизированного пептида-лактама в виде трифторацетатной соли.

Указанные ниже соединения получали аналогично с CP132070

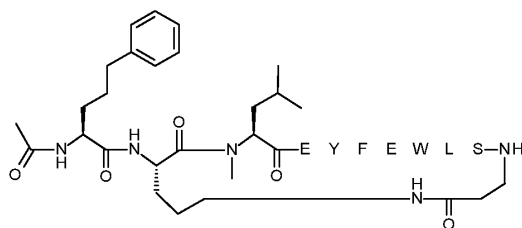
CP141019



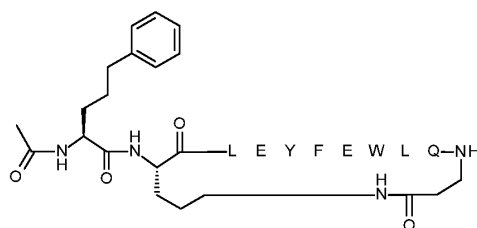
CP141036



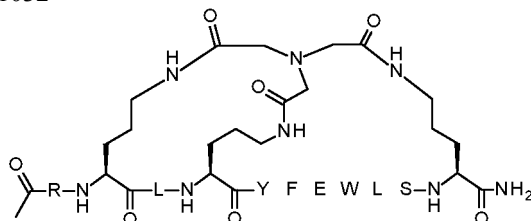
CP141037



CP141077



Пример 2. Синтез CP141032

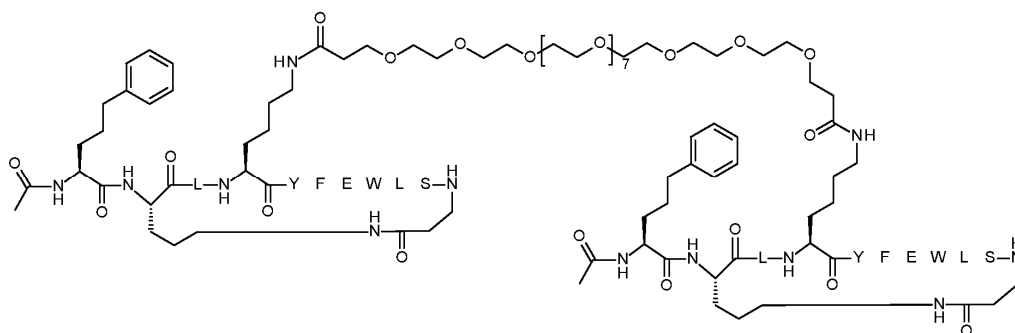


Линейный пептид-предшественник получали вручную путем твердофазного синтеза пептидов с использованием Fmoc-групп в масштабе 0,25 ммоль с применением смолы Sieber (0,69 ммоль/г). Функциональные группы боковых цепей аминокислот блокировали защитными группами, такими как N-Boc (W), O-трет-Bu (E, S, Y) и N-Pbf (R). Группу N-Dde использовали для ортогональной защиты функциональных аминогрупп боковой цепи орнитина (Boc: трет-бутоксикарбонил, трет-Bu: трет-бутил, Dde: 1-(4,4-диметил-2,6-диоксациклогексиден)этил, Fmoc: 9-фторенилметоксикарбонил, Pbf: 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил). Перед присоединением первой аминокислоты смолу замачивали в DMF в течение 1 ч. Использовали протокол связывания с применением 3 экв. Fmoc-аминокислоты в DMF (4 мл) и активирующей смеси, содержащей 2,85 экв. HBTU и 6 экв. DIPEA в DMF (4 мл); при этом реакционную смесь встряхивали в течение 1,5-2 ч во время каждой стадии связывания. Удаление Fmoc-группы проводили с помощью 20% раствора пиперидина в DMF (2×15 мин). N-концевое ацетилирование проводили на конце пептидной сборки путем обработки комплекса пептида и смолы смесью уксусного ангидрида и 4-метилморфолина в DMF (2:1:17, об./об./об., 20 мл) при комнатной температуре в течение 1 ч. Наконец, защитные группы N-Dde избирательно удаляли путем обработки комплекса пептида и смолы 3% раствором гидрата гидразина в DMF (3×10 мин.), после чего комплекс пептида и смолы промывали с помощью DMF и DCM.

Последующее отщепление пептида от смолы осуществляли путем взбалтывания комплекса пептида и смолы в течение 60 мин в растворе DCM, содержащем 1% TFA. Смолу отфильтровывали и промывали с помощью DCM. Фильтрат выливали в холодный простой изопропиловый эфир, что приводило к осаждению пептида. Выделение путем центрифугирования, промывка холодным простым изопропиловым эфиром и сушка под вакуумом давали 348 мг (выход: 55%, чистота: 80%) неочищенного линейного пептида, который применяли без дополнительной очистки на стадии циклизации, опосредованной TSAT (трис(сукцинимидил)аминотриацетатом).

Пептид с удаленной защитной группой с боковой цепи орнитина (150 мг, 80% чистота, 0,0595 ммоль) растворяли в DMF (300 мл) с последующим добавлением DIPEA до pH 8-9. К этой смеси добавляли по каплям раствор перекрестно-связывающего реагента TSAT (1,0 экв.) в DMF (50 мл), при этом полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока не наблюдали полное превращение. Удаление растворителя при пониженном давлении давало бициклический пептид, у которого удаляли все защитные группы путем обработки смесью 90% (об.) TFA, 5% (об.) тиоанизола, 2,5% (об.) H₂O и 2,5% (об.) EDT при комнатной температуре в течение 3 ч. Осаждение и промывка ледяным простым трет-бутилметилэфиром давали неочищенный циклический пептид, который очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC), как описано в примере 1. Лиофилизация чистых фракций давала 40 мг (выход: 34%, чистота 94%) бициклического пептида CP141032 в виде трифторацетатной соли.

Пример 3. Синтез гомодимерного пептида CP141100



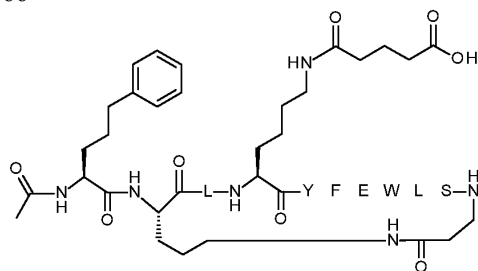
Линейный мономерный пептид-предшественник получали автоматизированным способом твердо-фазного синтеза пептидов с использованием Fmoc-групп в масштабе 0,5 ммоль с применением предварительно нагруженной β -аланином 2-хлортритилхлоридной смолы (0,29 ммоль/г). Функциональные группы боковых цепей аминокислот блокировали защитными группами, такими как N-Вос (W) и O-трет-Bu (E, S, Y). Группу N-Mtt применяли для ортогональной защиты функциональной аминогруппы боковой цепи орнитина (Вос: трет-бутоксикарбонил, трет-Bu: трет-бутил, Fmoc: 9-флуоренилметоксикарбонил, Mtt: метилтритил). Перед присоединением первой аминокислоты смолу замачивали в NMP (2×15 мин). Использовали протокол связывания с применением 10 экв. Fmoc-аминокислоты, 9 экв. HATU (N,N,N',N'-тетраметил-O-(7-азабензотриазол-1-ил)уридия гексафторфосфат, 0,45M в DMF) и 10 экв. DIPEA (2M в NMP) для каждой стадии связывания аминокислоты (длительность связывания: 30 мин). В случае двух N-концевых аминокислот применяли стратегию двойного связывания. Удаление Fmoc проводили с помощью 20% раствора пиперидина в NMP и отслеживали с помощью УФ-детекции. N-концевое ацетилирование проводили на конце пептидной сборки путем обработки избытком уксусного ангидрида в присутствии DIPEA (10 экв. 2M раствора в NMP) в течение 30 мин.

Отщепление пептида от смолы и избирательное удаление защитных групп Mtt с боковой цепи производили путем взбалтывания комплекса пептида и смолы в течение 60 мин в смеси 65% (об.) DCM (дихлорметан), 20% (об.) гексафторизопропанола, 10% (об.) трифторэтанола и 5% (об.) триэтилсилана (10 мл/г комплекса пептида и смолы). Смолу отфильтровывали и промывали с помощью DCM. Пептид осаждали из фильтрата путем добавления холодного простого диэтилового эфира, неочищенный продукт сушили под вакуумом и применяли без дополнительной очистки на следующей стадии.

Циклизацию в лактам проводили при высоком разведении путем растворения пептида с удаленной защитной группой с боковой цепи орнитина в 200 мл DMF с последующим добавлением по каплям раствора PyBOP (2 экв.) и N-метилморфолина (6 экв.) в DMF (60 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока не наблюдали полное превращение (2 ч). Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток повторно растворяли в этилацетате. Органическую фазу промывали водным 5% NaHCO_3 и соевым раствором и концентрировали при пониженном давлении. У циклизированного пептида удаляли все защитные группы путем обработки смесью 87,5% (об.) TFA, 5% (об.) тиоанизола, 5% (об.) H_2O и 2,5% (об.) EDT при комнатной температуре в течение 2 ч. Осаждение с последующей промывкой ледяным простым диэтиловым эфиром давало неочищенный пептид, который очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC) на колонке для препаративной HPLC XBridge C18 OBD (30×250 мм, 5 мкм, 140 Å) со скоростью потока подвижной фазы 30 мл/мин, (растворитель А: 0,1% TFA в воде+ CH_3CN , растворитель В: CH_3CN , применяли линейный градиент). Лиофилизация чистых фракций давала 250 мг (выход 31%, чистота: 83%) циклизированного пептида-лактама с полностью удаленными защитными группами на боковых цепях в виде трифторацетатной соли.

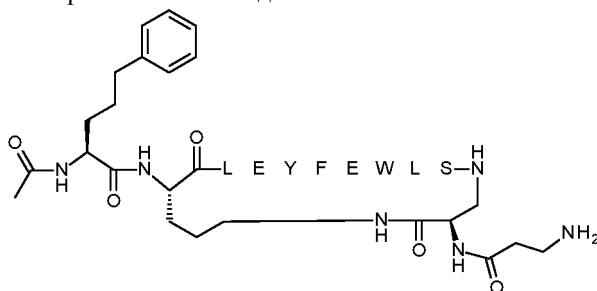
Димеризацию проводили с применением коммерчески доступного сложного бис-PEG13-NHS эфира (бис-сукцинимидил-активированной бис-PEG13-кислоты) в качестве связывающего реагента. Ее осуществляли путем добавления связывающего реагента (0,4 экв.) к раствору циклизированного пептида-лактама (75 мг, 0,048 ммоль) и Et_3N (5 экв.) в сухом DMF, при этом реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока больше не наблюдали никакого превращения. Растворитель удаляли при пониженном давлении и полученный в результате остаток непосредственно очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC), как описано выше. Лиофилизация чистых фракций давала 19 мг (выход: 11%, чистота 96%) димерного пептида CP141100.

Пример 4. Синтез CP141066



Промежуточный продукт в виде циклизированного пептида-лактама с полностью удаленными защитными группами на боковых цепях (50 мг, 0,032 ммоль) из примера 3 растворяли в DMF (2 мл). Добавляли Et₃N (5 экв.) и дисукцинимидилглутарат (1,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли при пониженном давлении и полученный в результате остаток очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой, как описано в примере 3. Лиофилизация чистых фракций давала 28 мг (выход: 56%, чистота 99%) пептида CP141066.

Пример 5. Синтез циклизированного пептида-лактама CP141099



Линейный пептид синтезировали в масштабе 0,3 ммоль автоматизированным способом твердофазного синтеза пептидов с использованием Fmoc-групп на предварительно нагруженной L-Dap(Fmoc) (Dap: 2,3-диаминопропионовая кислота) 2-хлортритилхлоридной смоле (0,15 ммоль/г). Предварительно нагруженную L-Dap(Fmoc) 2-хлортритилхлоридную смолу готовили вручную путем обработки 2-хлортритилхлоридной смолы (5 г, 1,4 ммоль/г, 7 ммоль) раствором Dde-L-Dap(Fmoc)-OH (0,66 экв.) в DMF в присутствии DIPEA (2,6 экв.). Полученную реакционную смесь встряхивали в течение 90 мин, добавляли метанол (2,5 мл) и продолжали встряхивание в течение дополнительных 5 мин. Растворитель удаляли фильтрацией и смолу промывали с помощью DMF (5x). Наконец, удаляли защитную группу N-Dde с помощью реакции с 2% раствором гидразингидрата в DMF (5×2 мин.) с получением нагруженной L-Dap(Fmoc) 2-хлортритилхлоридной смолы со степенью замещения 0,15 ммоль/г (степень замещения определяли фотометрически, на основании количества Fmoc-хромофора, высвобождаемого при обработке смолы раствором пиперидина в DMF). Последующие аминокислотные связывания и N-концевое ацетилирование проводили с помощью автоматизированного синтеза, как описано в примере 3. Важно отметить, что связывание Вос-β-аланина производили до удаления защитных Fmoc-групп на предварительно нагруженной L-Dap(Fmoc) 2-хлортритилхлоридной смоле.

Отщепление пептида от смолы и избирательное удаление защитных групп Mtt с боковой цепи производили путем взбалтывания комплекса пептида и смолы в течение 60 мин в смеси 65% (об.) DCM, 20% (об.) гексафторизопропанола, 10% (об.) трифторэтанола и 5% (об.) триэтилсилана (10 мл/г комплекса пептида и смолы). Смолу отфильтровывали и промывали с помощью DCM. Пептид осаждали из филтратом путем добавления холодного простого диэтилового эфира, неочищенный продукт сушили под вакуумом и применяли без дополнительной очистки на следующей стадии.

Циклизацию в лактам проводили при высоком разведении путем растворения пептида с удаленной защитной группой с боковой цепи орнитина в 120 мл DMF с последующим добавлением по каплям раствора RuBOP (2 экв.) и N-метилморфолина (6 экв.) в DMF (36 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до полного превращения (2 ч). Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток повторно растворяли в этилацетате. Органическую фазу промывали водным 5% раствором NaHCO₃ и соевым раствором и концентрировали при пониженном давлении. Полное удаление всех защитных групп проводили путем обработки смесью 87,5% (об.) TFA, 5% (об.) тиоанизола, 5% (об.) H₂O и 2,5% (об.) EDT при комнатной температуре в течение 2 ч. Осаждение с последующей промывкой ледяным простым диэтиловым эфиром давало неочищенный пептид, который очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой на колонке для препаративной HPLC XBridge C18 OBD (30×250 мм, 5 мкм, 140 Å) со скоростью потока подвижной фазы 20 мл/мин, (растворитель А: 0,1% TFA в воде+CH₃CN, растворитель В: MeOH, применяли линейный градиент). Лиофилизация чистых фракций давала 36 мг (выход 7%, чистота: 95%) циклизированного пептида-лактама

CP141099 в виде трифторацетатной соли.

Пример 6. Анализ пептидов.

Измерения при осуществлении UPLC (сверхпроизводительная жидкостная хроматография) и HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография) (HPLC) проводили с помощью насоса для LC, детектора на диодной матрице (DAD) или УФ-детектора и колонки, как описано в соответствующих способах. При необходимости включали дополнительные детекторы (см. приведенную ниже таблицу способов). Поток из колонки направляли в масс-спектрометр (МС), который был оснащен источником ионизации при атмосферном давлении. В пределах компетенции специалиста в данной области находится установка настраиваемых параметров (например, диапазон сканирования, минимальное время измерения) для получения ионов, дающих возможность определения молекулярной массы (MW) соединения. Сбор данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Пептиды описывали согласно их экспериментальному времени удержания (R_t) и молекулярной массе (MW). Все результаты получали с экспериментальными погрешностями, которые обычно ассоциированы с применяемым способом. Как применяется в данном документе, "MSD": масс-селективный детектор, "DAD": детектор на диодной матрице, "SQD": одноквадрольный детектор.

Таблица 1

Условное обозначение способов LCMS (поток выражен в мл/мин;
температура колонки (T) в °C; время анализа в минутах)

Условное обозначение способа	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток ----- T колонки	Время анализа
A	Agilent: 1200 HPLC-DAD и MSD	Agilent: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 мкм, 4,6*150 мм)	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,05% TFA в CH ₃ CN	От 70% A до 40% A за 20 мин. и до 20% A за 5 мин.	0,8 ----- 30	25
B	Agilent: 1200 HPLC-DAD и MSD	Agilent: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 мкм, 4,6*150 мм)	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,05% TFA в CH ₃ CN	От 90% A до 50% A за 20 мин. и до 10% A за 15 мин.	0,8 ----- 30	25
C	Waters: Acquity® UPLC® - DAD и SQD	Колонка BEH300C4 (1,7 мкм, 2,1*150 мм; Waters Acquity®	A: 0,1% HCOOH+5% CH ₃ OH в H ₂ O B: CH ₃ OH	От 95% A до 5% A за 14,0 мин. и удержание 1 мин.	0,2 ----- 30	15

Таблица 2

Анализ пептидов

ID соединения	R_t (мин.) #	Рассчитанная MW	Чистота (%) §
CP141099	7,80 (C)	1556,77	95
CP141019	15,34 (A)	1539,57	100
CP141037	14,10 (A)	1484,71	99
CP141066	7,12 (C)	1583,84	99
CP132070	14,07 (A)	1497,75	97
CP141036	14,01 (A)	1496,72	98
CP141077	12,63 (C)	1511,73	99
CP141100	8,64 (C)	3594,22	96
CP141032	16,04 (B)	1633,86	94

Аналитические способы (A, B, C), указанные в скобках, описаны выше.

§ Чистоту пептида рассчитывали как процент площади УФ-положительного (220 нм) элюированного материала под основным пиком хроматограммы.

Пример 7. Связывание соединений с НА гриппа и конкуренция соединений с другими НА-связывающими молекулами.

Разрабатывали исследования по конкурентному связыванию для тестирования конкуренции соеди-

нений с другими хорошо охарактеризованными НА-связывающими белками (в том числе, например, CR9114) с известными эпитопами на НА. Эпитопы находились либо на стебле НА (проксимальная часть НА относительно вирусной оболочки), либо, с целью контроля, на головке НА (дистальная часть НА относительно вирусной оболочки). Если наблюдали конкуренцию, то считалось, что обе молекулы связываются с одинаковым или, по меньшей мере, перекрывающимся эпитопом на поверхности НА. Конкуренцию с молекулой, связывающейся с головкой и стеблем НА, интерпретировали как неспецифическое связывание.

Для этого был создан конкурентный анализ AlphaLISA (Perkin Elmer), в основе которого лежат биотинилированные полноразмерные и тримерные белки НА (Protein Sciences, 10 мкл, конечная концентрация 0,5 нМ в 50 мкл), связанные НА-специфичными связывающими молекулами. Взаимодействие между НА и связывающей молекулой обнаруживали после 1 ч инкубации при комнатной температуре (RT) с помощью двух типов гранул: донорной гранулы со стрептавидином, распознающей НА (10 мкл 10 мкг/мл), и гранулы с антителом к Fc (10 мкг/мл), распознающей применяемые IgG. Если после дополнительного часа инкубации при RT возбужденная донорная гранула (при 680 нм) и акцепторная гранула оказывались в непосредственной близости, то перенос энергии (образование синглетного кислорода) можно было измерить в виде сигнала люминесценции акцепторной гранулы (планшет-ридер Envision от Perkin Elmer). Интенсивность сигнала в данном гомогенном формате анализа прямо пропорциональна силе связывания (аффинность/авидность) между обоими партнерами по связыванию. Конкурирующая молекула (соединение), в зависимости от ее аффинности и концентрации (обычно тестируемая в диапазоне от 100 нМ до 0,5 пМ), могла нарушать сигнал AlphaLISA, что приводило к сигмоидальной кривой ингибирования, которую аппроксимировали с применением стандартной четырехпараметрической логистической модели нелинейной регрессии в SPSS. Средние рассчитанных значений pIC_{50} показаны в табл. 3.

Таблица 3

Конкуренция соединения за связывание с НА вируса гриппа А (значения представляют собой средние pIC_{50} , отрицательный логарифм полумаксимальной ингибирующей концентрации, более высокие значения указывают на экспоненциально большую эффективность, пустые клетки означают "не тестировали")

Соединение	H1					H5	H2
	A/New Caledonia/20/1999 НА-Молекула, связывающаяся со стеблем	A/California/07/2009 НА + Молекула, связывающаяся с головкой	A/California/07/2009 НА + Молекула, связывающаяся со стеблем	A/Brisbane/59/07 НА + Молекула, связывающаяся со стеблем	A/South Carolina/20/18 НА + Молекула, связывающаяся со стеблем	A/Vietnam/1203/04 НА + Молекула, связывающаяся со стеблем	A/Singapore/1/57 НА + Молекула, связывающаяся со стеблем
CP132070	6,75	<4,30	6,54			7,16	
CP141019	7,30	<4,30	7,15	7,33	7,10	7,39	6,05
CP141036	6,87	<4,30	6,40	6,84	6,26	7,19	5,56
CP141037	7,09	<4,30	6,69	7,06	6,82	7,21	5,54
CP141066	6,73	<4,30	6,61			6,93	
CP141077	6,75	<4,30	6,37	6,59	6,29	6,65	5,53
CP141099	7,56	<4,30	7,23	7,17	7,09	7,35	5,94
CP141100	6,19	<4,30	6,24	5,88	5,13	6,76	4,53
CP141032	5,65	<4,30	5,02			5,59	

В заключение следует отметить, что согласно настоящему изобретению было показано, что соединения по настоящему изобретению обладают широким спектром связывания с вирусами гриппа А группы 1 и специфически конкурируют с молекулами, связывающимися со стеблем НА, но не с контрольными молекулами, связывающимися с головкой НА.

Пример 8. Нейтрализующая активность в отношении вируса гриппа и клеточная токсичность соединений.

Соединения анализировали в анализе нейтрализации вируса (VNA) в отношении их способности предупреждать инфицирование клеток млекопитающих вирусом гриппа. С этой целью клетки Calu-3,

полученные из эпителия легкого человека (ATCC, № по кат. НТВ-55), высевали в 96-луночные планшеты (4E+04 клеток/лунка) и инкубировали в течение по меньшей мере 7 дней при 37°C и в атмосфере 10% CO₂ в полной DMEM (содержащей 1x раствор не относящихся к незаменимым аминокислот MEM, 2 mM L-глутамин и 10% FBSH1, происхождение: Австралия; Gibco). Поляризованные клетки Calu-3 при кон- флюентности приблизительно 90% и с установившимися плотными контактами были готовы для VNA. В день анализа из исходного раствора соединения (растворенного в PBS 0,1% BSA, 0,1% Tween 5% DMSO, исходная концентрация 500 мМ) подготавливали планшеты с разведенными образцами путем 2-кратного разведения в неполной DMEM (содержащей 2 mM L-глутамин, 1x пенициллин/стрептавидин). Планше- ты с разведенными образцами центрифугировали (1000 g в течение 15 мин) для удаления потенциальных агрегатов. Затем в планшет с разведенными образцами добавляли 5 TCID₅₀/50 мкл вируса гриппа (пред- варительно оттитрованного на клетках Calu-3) в неполной DMEM и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 10% CO₂. От клеток удаляли среду и заменяли на 50 мкл неполной DMEM, дополненной 3% FBS. Затем к клеткам добавляли 100 мкл смеси вирус/соединение, что давало общий объем анализа 150 мкл с конечной концентрацией 1% FBS. После инкубации в течение 4 дней при 37°C и 10% CO₂ клетки промы- вали PBS и фиксировали с помощью 80% ацетона из расчета 200 мкл/лунка в течение 15 мин при ком- натной температуре (RT). Уровень инфицирования гриппом определяли с помощью ELISA в отношении нуклеопротеинов (NP) вируса гриппа. Применяли первичное антитело к Flu-A-NP (Abbiotec, клон 5D8) из расчета 1:1000, разведенное в 1% BSA в PBS и инкубировали в течение 1 ч при встряхивании со ско- ростью 300 об/мин при RT. После трехкратной промывки клеток с помощью промывочного буфера (PBS, 0,05% Tween) добавляли вторичное антитело (антитело к мышинным антителам, конъюгированное с HRP, 1:2000) и инкубировали в течение 1 ч при встряхивании со скоростью 300 об/мин при RT. После трех- кратной промывки клеток добавляли хемилюминесцентный субстрат POD из расчета 50 мкл/лунка и ин- кубировали в течение 2-5 мин перед считыванием люминесценции на планшет-ридере Synergy Neo от компании Biotek. С помощью программного обеспечения SPSS рассчитывали pIC₅₀ соединений. Тести- ровали множество штаммов гриппа в повторях для оценки спектра нейтрализации (см. табл. 4).

Для определения уровня клеточной токсичности также проводили VNA в отсутствие вируса. Цито- патический эффект (CPE) измеряли с помощью реагента ATP Lite и в соответствии с протоколом произ- водителя (Perkin Elmer), а полученные данные анализировали аналогичным способом (см. табл. 4).

Таблица 4

Соединения, нейтрализующие вирус гриппа (значения представляют собой средние pIC₅₀, отрицательный логарифм полумаксимальной ингибирующей концентрации, более высокие значения указывают на экспоненциально большую эффективность, пустые клетки означают "не тестировали")

Соединение	Токсичность	VNA H1N1 A/California/ 07/09	VNA H1N1 A/New Caledonia/ 20/99	VNA H5N1 A/Vietnam/ 1194/04
CP132070	<4,00	<4,00	4,08	4,42
CP141019	<4,00	7,66	7,16	7,09
CP141036	<4,00	4,02	5,86	6,77
CP141037	<4,00	4,13	6,29	6,17
CP141066	<4,00	<4,00	4,38	4,32
CP141070	<4,00	4,17	4,18	<4,00
CP141077	<4,00	4,25	4,98	5,35
CP141100	<4,00	7,49	7,60	7,80
CP141032	<4,00		4,23	<4,00

В заключение необходимо отметить, что соединения по настоящему изобретению обладают широ- ким спектром нейтрализации в отношении штаммов вируса гриппа группы 1 при отсутствии детектируе- мой клеточной токсичности.

Таблица 5

Стандартные аминокислоты, аббревиатуры и свойства

Аминокислота	3-буквенная	1-буквенная	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
аланин	Ala	A	неполярная	Нейтральный
аргинин	Arg	R	полярная	Положительный
аспарагин	Asn	N	полярная	Нейтральный
аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	Отрицательный
цистеин	Cys	C	неполярная	Нейтральный
глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	Отрицательный
глутамин	Gln	Q	полярная	Нейтральный
глицин	Gly	G	неполярная	Нейтральный
гистидин	His	H	полярная	Положительный (10%) ; нейтральный (90%)
изолейцин	Ile	I	неполярная	Нейтральный
лейцин	Leu	L	неполярная	Нейтральный
лизин	Lys	K	полярная	Положительный
метионин	Met	M	неполярная	Нейтральный
фенилаланин	Phe	F	неполярная	Нейтральный
пролин	Pro	P	неполярная	Нейтральный
серин	Ser	S	полярная	Нейтральный
треонин	Thr	T	полярная	Нейтральный
триптофан	Trp	W	неполярная	Нейтральный
тирозин	Tyr	Y	полярная	Нейтральный
валин	Val	V	неполярная	Нейтральный

Пример 9. Эксперименты по прямому связыванию НА с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Все SPR-эксперименты проводили с применением прибора Biacore T200 (GE Healthcare), функционирующего при 25°C. Тримерные белки НА (Protein Sciences) случайным образом биотинилировали и ковалентно иммобилизовали на покрытой стрептавидином поверхности сенсора из карбоксиметилированного декстрана (SA chip, GE Healthcare). Тестируемые соединения ресуспендировали в подвижном буфере (20 mM PBS, 137 mM NaCl, 0,05% поверхностно-активного вещества P-20, pH 7,4 (GE Healthcare), дополненном 2% DMSO) и константы связывания получали по результатам серии инъекций соединений в диапазоне концентраций от 0,1 нМ до 10 мкМ при скорости потока 30 мкл/мин. Данные по кинетике одного цикла анализировали с применением программного обеспечения BIAevaluation. Базовые линии корректировали до нуля для всех кривых и выравнивали время начала инъекции. Эталонные сенсограммы вычитали из экспериментальных сенсограмм с получением кривых, представляющих специфическое связывание, с последующим вычитанием фона (т.е. двойное сравнение с эталоном). Кинетику связывания оценивали с применением модели связывания 1:1 (Лэнгмюра) с получением констант скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d). Аффинность связывания (KD) оценивали по зависимости от концентрации наблюдаемых равновесных реакций. Эксперименты проводили трижды, чтобы убедиться в воспроизводимости.

Кривые связывания в типичных экспериментах для трех соединений, связывающихся с НА от трех штаммов гриппа (A/California/07/09 (H1), A/New Caledonia/20/99 (H1) и A/Vietnam/1194/04 (H5)), представлены на чертеже. Для всех трех соединений были обнаружены аффинности связывания в диапазоне от 10 до 100 нМ, при этом скорости диссоциации составляли от 5 с^{-1} до $2 \cdot 10^{-1} \text{ с}^{-1}$ в зависимости от штамма НА, как представлено в табл. 6.

Таблица 6

Значения pK_D со стандартным отклонением $SD\ pK_D$ и соответствующей скоростью диссоциации k_d [с⁻¹] для CP141037, CP141019 и CP141099. Каждое соединение было протестировано на связывание с НА, полученным от трех штаммов вируса гриппа (A/California/07/09 (H1), A/New Caledonia/20/99 (H1) и A/Vietnam/1194/04 (H5))

Соединение	НА	pK_D	$SD\ pK_D$	k_d (с ⁻¹)
CP141037	A/California/07/09 (H1)	7,21	0,14	1,84E-01
CP141037	A/New Caledonia/20/99 (H1)	7,35	0,16	7,53E-02
CP141037	A/Vietnam/1194/04 (H5)	7,19	0,33	8,45E-02
CP141019	A/California/07/09 (H1)	7,77	0,11	1,82E-01
CP141019	A/New Caledonia/20/99 (H1)	7,75	0,13	5,89E-02
CP141019	A/Vietnam/1194/04 (H5)	7,50	0,29	5,33E-02
CP141099	A/California/07/09 (H1)	7,58	0,16	2,52E-01
CP141099	A/New Caledonia/20/99 (H1)	7,60	0,18	1,01E-01
CP141099	A/Vietnam/1194/04 (H5)	7,56	0,35	6,52E-02

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение-пептидомиметик, имеющее последовательность

Cap1-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Leu-X9-X10-Cap2,

где Cap1 представляет собой ацетил;

X1 представляет собой (S)-2-амино-5-фенилпентановую кислоту;

X2 представляет собой L-орнитин;

X3 представляет собой Leu, L-циклопентилаланин или их N-метилированное производное;

X4 представляет собой Glu, Arg, L-орнитин или N6-(4-карбоксибутаноил)лизин;

X5 представляет собой Tyr;

X6 представляет собой Phe или L-3,4-дихлорфенилаланин;

X7 представляет собой Glu;

X8 представляет собой Trp;

X9 представляет собой Ser или Gln;

X10 представляет собой β -аланин, ((2R)-3-амино-2-(3-аминопропаноиламино)- β -аланин или L-орнитин; и

Cap2 отсутствует,

и где соединение может специфически связываться с гемагглютинином (НА) по меньшей мере двух штаммов вируса гриппа А, содержащих НА двух разных подтипов из филогенетической группы 1, и где соединение циклизовано посредством образования амидной связи, включающей остатки X2 и/или X4 и X10.

2. Соединение по п.1, где X2 представляет собой L-орнитин, а X10 представляет собой β -аланин.

3. Соединение по п.1, где X4 представляет собой L-орнитин, а X10 представляет собой β -аланин.

4. Соединение по п.1, где соединение циклизовано за счет внутримолекулярного сшивания свободных аминогрупп, введенных в остатки X2, и X4, и X10, с помощью трис-сукцинимидиламинотриацетата (TSAT).

5. Мультимерное соединение-пептидомиметик, содержащее по меньшей мере два соединения по любому из пп.1-4.

6. Мультимерное соединение по п.5, где соединение является димерным.

7. Мультимерное соединение по п.5 или 6, где соединение было димеризовано за счет межмолекулярного сшивания реакционноспособных групп, введенных в остаток X4.

8. Фармацевтическая композиция для диагностики, профилактики и/или лечения гриппа А, содержащего НА из филогенетической группы 1, содержащая соединение по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

9. Применение соединения по любому из пп.1-7 в диагностике, профилактике и/или лечении гриппа, вызванного инфекцией вирусом гриппа А, содержащим НА из филогенетической группы 1.

10. Применение соединения по любому из пп.1-7 в получении лекарственного средства для диагностики, профилактики и/или лечения гриппа, вызванного инфекцией вирусом гриппа А, содержащим НА из филогенетической группы 1.

